



Revista EDUCATECONCIENCIA.
Volumen 16, No. 17.
ISSN: 2007-6347
Periodo: Octubre-Diciembre 2017
Tepic, Nayarit. México
Pp. 32-47

Recibido: 08 de Octubre
Aprobado: 31 de Octubre

**Daño celular por el efecto de la temperatura en los espermatozoides
criopreservados de cerdo**

**Cell damage due to the effect of temperature on cryopreserved porcine
spermatozoa**

Autores

María Guadalupe Orozco Benítez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
mgorozco63@gmail.com

Rafael Murray Núñez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
ramurray_13@hotmail.com

Raúl Navarrete Méndez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
namerdsd@gmail.com

J. Antonio Hernández Ballesteros

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
mvzballesteros@hotmail.com

Daño celular por el efecto de la temperatura en los espermatozoides criopreservados de cerdo

Cell damage due to the effect of temperature on cryopreserved porcine spermatozoa

Autores

María Guadalupe Orozco Benítez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
mgorozco63@gmail.com

Rafael Murray Núñez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
ramurray_13@hotmail.com

Raúl Navarrete Méndez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
namerdsd@gmail.com

J. Antonio Hernández Ballesteros

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
mvzballesteros@hotmail.com

Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto de la temperatura de criopreservación en espermatozoides de cerdo, las variables evaluadas fueron: motilidad progresiva, espermatozoides vivos, espermatozoides vivos con acrosoma y espermatozoides vivos sin acrosoma en cerdos de diferentes grupos raciales. Se analizaron por triplicado las muestras de semen (fresco y descongelado). La temperatura de criopreservación provocó cambios ($P < 0.05$) en el espermatozoide de cerdo, una disminución en el porcentaje de espermatozoides motiles, de fresco a descongelado (85 % vs 29.88 %), el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó de semen fresco a descongelado (81.00 % vs 31.94 %), los espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó de fresco a descongelado (75.33 % vs 31.23 %). El espermatozoide a temperaturas de (-130°C a -196°C) experimentó criocapacitación.

Palabras clave: Criopreservación, motilidad, acrosoma, espermatozoide.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of cryopreservation temperature on pig spermatozoa, the variables evaluated were: progressive motile, live spermatozoa, live spermatozoa with acrosome and live spermatozoa without acrosome in

pigs of different racial groups. Samples of semen (fresh and thawed) were analyzed in triplicate. Cryopreservation temperature caused changes ($P < 0.05$) in pig spermatozoa, a decrease in the percentage of motile sperm from fresh to thawed (85% vs 29.88%), the percentage of live spermatozoa decreased from fresh to thawed semen (81.00% vs. 31.94%), spermatozoa with intact acrosome decreased from fresh to thawed (75.33% vs 31.23%). The spermatozoon at temperatures of (-130 ° C to -196 ° C) underwent cryocapacitation.

Keywords: Cryopreservation, motility, acrosome, sperm.

Introducción

El daño celular que ocurre por la congelación y la descongelación se refleja en una disminución de la motilidad y daños ultraestructurales en la membrana (Johnson et al., 2000). Sin embargo, a la fecha persiste el problema de que aún con las mejores técnicas de preservación la sobrevivencia de la población espermática después del congelamiento, es cercana al 50 % (Guthrie y Welch, 2005, Yeste 2015).

El espermatozoide al ser sometido al proceso de congelación, experimenta daños y solamente sobrevive una cierta población de espermatozoides que probablemente son resistentes, debido a que sus membranas son inusualmente estables, de esta manera se estaría seleccionando una cierta población viable, pero a la vez infértil, ya que el proceso de congelación por sí mismo genera modificaciones en las membranas celulares (Watson, 1995, Namula et al., 2013).

Por lo que posiblemente en cada uno de los pasos de la criopreservación podría estar perdiendo alguna habilidad funcional. Por ejemplo, varios organelos de la célula espermática están envueltos por una membrana y es sabido que las membranas espermáticas afectadas por la criopreservación incluyen la plasmática, las acrosomales y las mitocondriales. A excepción de las mitocondrias las demás membranas están regionalmente diferenciadas, desplegando distinto comportamiento y por lo tanto una composición variable. (Watson, 1995).

La evaluación del semen para su uso en la inseminación artificial y congelación, ha sido basada principalmente en el examen microscópico de la motilidad y morfología del espermatozoide. Sin embargo; aunque estas evaluaciones son valiosas no siempre son exactas (Ostermeier et al., 2000). Diversos autores reportan que el daño producido por el proceso de congelación-descongelación ocurre principalmente en la membrana plasmática (Watson, 1995; Noiles et al., 1997; Neild et al., 2003; López et al., 2013; Yeste 2015).

El semen porcino difiere de otras especies de animales domésticos, ya que es producido en gran volumen, pero es extremadamente sensible al choque por frío; inmediatamente después de su colección sólo tolera niveles relativamente bajos de glicerol para su congelamiento, características que deben ser consideradas al realizar el proceso de criopreservación, ya que se sabe que esta técnica induce daños en el espermatozoide (Watson, 2000; Holt et al., 2005; Meyers, 2005).

El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios que ocurren en los espermatozoides por el efecto de la temperatura de criopreservación en el porcentaje de motilidad progresiva, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma intacto en los cerdos de razas comerciales.

Metodología

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, ubicada en la Ciudad de Compostela Nayarit., en el Km. 3.5 de la carretera de cuota Compostela-Chapalilla. Localizada geográficamente al suroeste del estado de Nayarit, a una altitud de 1021 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media anual de 18°C, cuenta con un clima templado seco y una precipitación pluvial de 900 mm.

Animales Experimentales. Tres sementales, uno de cada raza comercial (Yorkshire, Landrace y Duroc). Se obtuvieron tres eyaculados por semental, de manera alterna y se evaluaron por triplicado en fresco y en descongelado. Los sementales permanecieron estabulados en una corraleta individual, alimentados con la dieta de la granja y agua a libre acceso. La colección del semen se realizó en las horas más frescas de

la mañana, por medio de la técnica de mano enguantada, se colectó únicamente la fracción rica en espermatozoides, en un recipiente térmico de boca ancha a 37°C, provisto de una bolsa de plástico con un filtro para separar la porción gelatinosa (Rillo-Martin, et al., 1996). Se obtuvieron tres eyaculados por cada semental en forma alternada.

Inmediatamente después de obtener el eyaculado, se evaluó por medio de técnicas de laboratorio, tanto macroscópicas (volumen, color, temperatura), como microscópicas (motilidad, concentración espermática, relación de espermatozoides vivos y muertos y anormalidades), con el propósito de determinar la calidad del eyaculado (Córdova et al., 1995; Hernández, 1998).

Sólo se congelaron eyaculados con más del 80% de motilidad, menos del 15% de morfoanomalías, y una concentración espermática de 300 X10⁶ por mL.

Congelación del Semen. Para la congelación se utilizó el método descrito por Westendorf et al. (1975) y modificado por (Bwanga et al., 1990; Córdova y Pérez., 2001).

Descongelación. Después de 15 días de almacenamiento, se descongelaron las pajillas en un baño María a 56°C durante 16 segundos se dejó estabilizar por 3 minutos a temperatura ambiente. El contenido de la pajilla se depositó en un tubo de ensayo con 0.5 mL de diluyente B.T.S. a 37°C dentro del baño María para continuar con la evaluación de las variables a medir.

Diseño Experimental y variables medidas

El diseño utilizado fue completamente al azar con submuestreo, considerando como submuestreo los diferentes eyaculados en cada raza.

Los datos se analizaron con un análisis de varianza, de acuerdo a la metodología descrita por Steel et al. (1997), empleando el paquete computacional (SAS) comparando las medias para establecer sus diferencias, con la prueba de Tuckey ($P < 0.05$).

Las variables que se midieron fueron:

Porcentaje de motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma.

Motilidad progresiva

Para la evaluación de la motilidad, se depositó una gota de semen sobre un portaobjetos, previamente atemperado a 37°C y se cubrió con un cubre objetos; inmediatamente se observó al microscopio con el objetivo seco débil (10X) emitiendo un valor de 0 a 100 % a la proporción de los espermatozoides, con movimiento rectilíneo-progresivo (Rillo, et al., 1996). Esta evaluación fue realizada por dos personas para disminuir el efecto del evaluador.

Espermatozoides vivos

Se utilizó la tinción de eosina-nigrosina (Barth y Oko, 1989). El porcentaje de espermatozoides vivos se evaluó, a través de la observación de un frotis en el microscopio óptico. La evaluación se hizo tanto para semen fresco como descongelado y se utilizó una platina caliente a 37°C, para mantener atemperado el colorante y portaobjetos y evitar cambios bruscos de temperatura que modifiquen los resultados. Para hacer el frotis se depositó una gota de semen y una gota de colorante eosina-nigrosina, se mezclan perfectamente con un palillo de madera y luego con la ayuda de otro portaobjetos se extendió la muestra formando una capa delgada, y se dejó secar a temperatura ambiente.

Posteriormente se procedió a la evaluación, empleando el microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100X). Se contaron 100 células en diferentes campos ópticos y se consideró: Espermatozoides muertos (los que tiñeron su cabeza de color rosa) y Espermatozoides vivos (Los que no se les tiño la cabeza). (Relación de espermatozoides vivos muertos = vivos – muertos) (Hernández, 1998).

Evaluación de la integridad del Acrosoma.

Se realizó con la técnica de Triple tinción (Talbot y Chacon, 1981). Se tomó una alícuota del semen fresco y descongelado y se lavó por centrifugación/resuspensión a 2000 rpm/5 min, con PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM y Na₂HPO₄ 9.6 mM, pH 7.4) para retirar el exceso de diluyente o yema de huevo.

Se utilizó una muestra de 100 µL de semen con una concentración espermática aproximada de 35X10⁶ y se adicionaron 100 µL de azul tripán (al 2 % en PBS), se incubó a 37°C en baño María durante 15 minutos. Después se lavó la muestra con PBS por centrifugación/resuspensión a 1200 rpm/3 minutos, para retirar el exceso de colorante, hasta que el sobrenadante se observó transparente; se fijó con 100 µL de glutaraldehído (al 3 % en amortiguador de cacodilato 0.1M pH 7.4), y se refrigeró a 4°C durante 30 minutos.

Después por centrifugación/resuspensión se lavó la muestra con PBS a 1200 rpm/8 minutos, el sobrenadante se desechó y el sedimento fue resuspendido en 100 µL de PBS; se tomaron 30 µL, para hacer un frotis que se dejó secar al aire. El frotis se sumergió en café Bismack (al 0.8 % en solución acuosa pH1.8) en baño María a 37°C durante 15 minutos, luego se lavó con agua destilada para retirar el exceso de colorante, y se tiñó con colorante rosa de bengala (al 0.8 % en amortiguador Tris 0.1M, pH 5.3) a temperatura ambiente durante 15 minutos, se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire para su observación al microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100X).

Se contaron 100 espermatozoides en diferentes campos ópticos para cada muestra. Los espermatozoides fueron clasificados como se describe a continuación:

Vivo, con acrosoma intacto	Café, sobre la región posacrosomal/rosa, sobre la región acrosomal
Vivo, sin acrosoma:	Café, sobre la región posacrosomal/sin tinción, en la región posacrosomal
Muerto, con acrosoma intacto	Azul, sobre la región posacrosomal/rosa, sobre la región acrosomal.
Muerto, sin acrosoma	Azul, sobre la región posacrosomal/ sin tinción, sobre la región acrosomal.

Resultados

Efecto de la temperatura de criopreservación sobre la viabilidad del espermatozoide.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en el cuadro 1, estos demuestran que la temperatura de criopreservación, provocó cambios significativos ($P < 0.05$) en el espermatozoide de cerdo, en las variables (motilidad progresiva, espermatozoides vivos, espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides vivos sin acrosoma; cuando la célula espermática es sometida al proceso de criopreservación.

Cuadro 1. Diferencias numéricas en los porcentajes de cada variable, considerando el efecto de la temperatura de criopreservación.

Variable	Fresco	Descongelado	Diferencia
Motilidad	85.00 ^a	29.88 ^b	55.12
Spz. Vivos	81.00 ^a	31.94 ^b	49.06
Spz. Vivos con acrosoma intacto	75.33 ^a	31.23 ^b	44.1
Spz. Vivos sin acrosoma	9.88 ^a	12.67 ^b	2.76
Spz. con RA	6.44 ^b	11.55 ^a	5.11

Spz. (espermatozoides).

RA (reacción acrosomal).

Medias con letra diferente por fila son diferentes significativamente ($P < 0.05$, Tukey).

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura de criopreservación sobre la motilidad progresiva que se observan en el cuadro 2 y en la siguiente gráfica 1, mostraron una disminución significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de espermatozoides motiles en el semen descongelado en los grupos raciales estudiados.

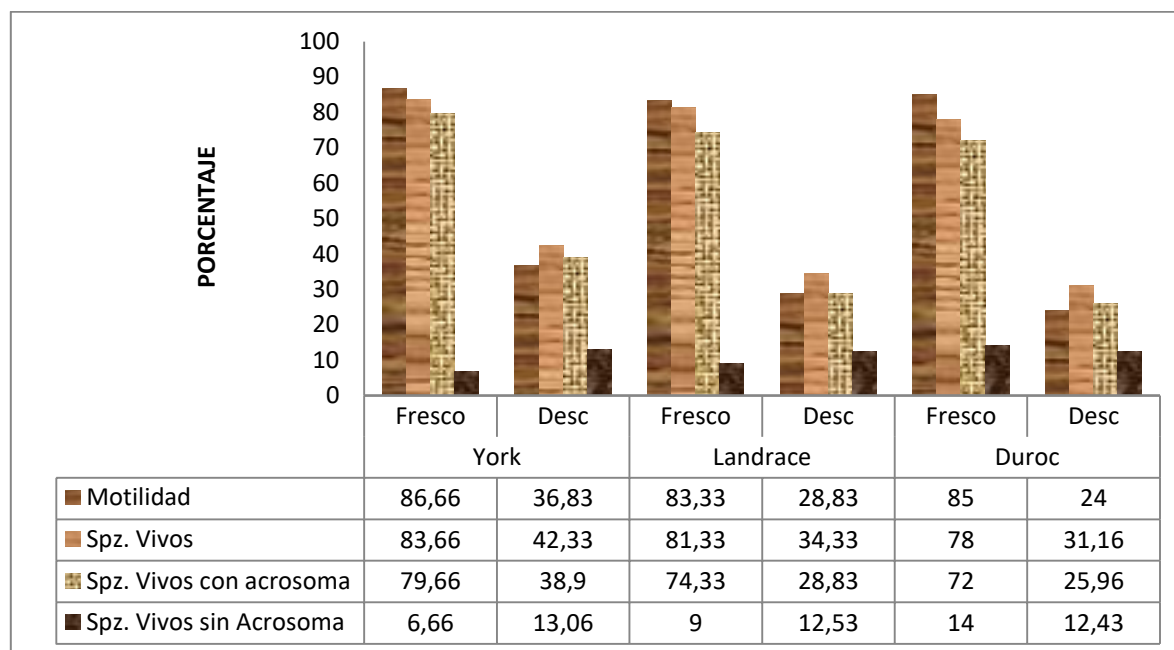
En semen fresco el porcentaje de espermatozoides motiles no presentó diferencias significativas entre razas.

Sin embargo cuando se descongeló los resultados reportaron una disminución significativa ($P < 0.05$) En la raza Yorkshire disminuyó el 49.83 %, en Landrace 54.5 %, y en la raza Duroc el 61.00 %. El porcentaje más alto de pérdida de motilidad progresiva se obtuvo en la raza Duroc.

Cuadro 2. Medias globales para las variables estudiadas en el espermatozoide fresco y descongelado en los diferentes grupos raciales.

Razas	Yorkshire		Landrace		Duroc	
Tratamientos	Fresco	Descong	Fresco	Descong	Fresco	Descong
Variables						
Motilidad	86.66 ^a	36.83 ^b	83.33 ^a	28.83 ^b	85.00 ^a	24.00 ^b
Spz. vivos	83.66 ^a	42.33 ^b	81.33 ^a	34.33 ^b	78.00 ^a	31.16 ^b
Spz. vivos con acrosoma intacto	79.66 ^a	38.9 ^b	74.33 ^a	28.83 ^b	72.00 ^a	25.96 ^b
Spz. vivos sin acrosoma	6.66 ^b	13.06 ^a	9.00 ^a	12.53 ^a	14.00 ^a	12.43 ^a

Medias con la letra diferente por fila, son diferentes significativamente en las comparaciones en cada raza (P< 0.05, Tukey).
 Spz. (espermatozoides).



Gráfica 1. Efecto de la temperatura de criopreservación, sobre la viabilidad del espermatozoide (motilidad progresiva, espermatozoides vivos, espermatozoides vivos con acrosoma, espermatozoides vivos sin acrosoma).

Spz (espermatozoide)
 Desc (descongelado)

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura sobre los espermatozoides vivos, que se mostraron en el cuadro 2 y en la siguiente gráfica 1, revelaron una disminución significativa ($P<0.05$) de espermatozoides vivos en los grupos raciales estudiados al descongelar.

En semen fresco el porcentaje de espermatozoides vivos no presentó diferencias significativas entre razas.

El cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en la membrana plasmática de los espermatozoides y ocasionó la muerte de la célula espermática, los resultados manifiestan una disminución significativa ($P<0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos en la razas; Yorkshire 41.33 %, Landrace 47.00 % y Duroc 46.84 %.

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la temperatura sobre los espermatozoides vivos con acrosoma intacto que se mostraron en el cuadro 2 y en la siguiente gráfica 1, muestran una disminución significativa ($P<0.05$) de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en los grupos raciales estudiados al descongelar el semen.

En semen fresco el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto no presentó diferencias significativas entre razas.

El cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en las membranas de los espermatozoides, los daños ocasionaron una disminución significativa ($P<0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, en el semen descongelado. El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto disminuyó en la razas; Yorkshire, Landrace y Duroc el 40.76 %, 45.5 % y 46.04 % respectivamente. En la raza Yorkshire, se observó un aumento significativo ($P<0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma de 6.40 %.

Discusión

Los resultados obtenidos en esta investigación, mostraron que la temperatura de criopreservación provocó cambios significativos ($P<0.05$) en el espermatozoide de cerdo,

en las variables consideradas en este experimento como parámetros de viabilidad. La temperatura de criopreservación, causó daños en la membrana plasmática del espermatozoide, provocando una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides motiles, de fresco a descongelado (85 % vs 29.88 %), así como también la muerte de los espermatozoides, resultado que reflejó una disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos, de semen fresco a descongelado (81.00 % vs 31.94 %), en consecuencia de este proceso de desestabilización de las membranas por la temperatura de criopreservación, el espermatozoide experimentó una prematura reacción acrosomal, provocando una disminución de espermatozoides con acrosoma intacto de fresco a descongelado (75.33 % vs 31.23 %), el espermatozoide al ser sometido a temperaturas de (-130°C a -196°C) experimentó lo que se conoce como capacitación prematura o criocapitación la cual provocó una disminución en el porcentaje de espermatozoides no capacitados de semen fresco a descongelado (83.33 % vs 43.44 %).

Estos resultados coinciden con los reportados por (Watson, 1995; Curry, 2000; Holt et al., 200; Namula et al., 2013; L. Fraser et al., 2014), al congelar semen de cerdo. Watson (1995) reportó, que los espermatozoides que sobreviven a la congelación-descongelación experimentan alteraciones similares a las causadas por la capacitación.

La evaluación de la motilidad y la morfología son los estándares comunes para determinar la viabilidad del espermatozoide in vitro, a pesar de que se conoce que el espermatozoide que sobrevive el congelamiento, puede ser motil, pero no necesariamente fértil (Polge, 1970; Sellés et al., 2001; Ruiz et al., 2002, 2003; Gadea et al., 2003; Namula et al., 2013; L. Fraser et al., 2014).

Con respecto a la motilidad progresiva, los resultados que se obtuvieron en el presente estudio revelaron que el cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó en los espermatozoides pérdida de la motilidad, con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre razas. El porcentaje más alto de espermatozoides motiles se observó en la raza Yorkshire, el segundo lugar para la raza Landrace y con el porcentaje más bajo la raza Duroc. Resultados que coinciden con lo reportado por Almid y Hofmo (1996), para la raza Duroc, con el menor porcentaje de motilidad, y se coincide también con los resultados

reportados para las razas Landrace y Yorkshire con los mejores porcentajes de motilidad al congelado-descongelado. (Arancibia-Salinas, et al., 2007), reportaron resultados muy similares de motilidad en semen congelado-descongelado de cerdos de las razas Yorkshire, Landrace, Duroc y Pelón Mexicano.

Flores, (2005), reportó resultados similares con disminución de motilidad espermática al congelar semen de cerdo con enfriado lento, hasta -5°C previo a la congelación. Estudios realizados en Europa y en los Estados Unidos muestran que la motilidad espermática en cerdos puede variar entre un 20 y 50 % después de la congelación (Almlid and Hofmo, 1996; Gadea et al., 2001, 2003; Namula et al., 2013; L. Fraser et al., 2014).

El proceso de congelado-descongelado del semen ocasiona una disminución en el porcentaje de espermatozoides motiles, lo que afecta el éxito en la gestación de las cerdas inseminadas con este tipo de células (Huang et al., 1999, Ruiz et al., 2002, 2003; Gadea et al., 2003; Roca et al., 2003; Yeste 2015), por lo que se recomienda usar un enfriado lento hasta -5°C y aumentar la velocidad de enfriado por debajo de esta temperatura (Bwanga et al., 1991b; Medrano et al., 2002; Kumar et al., 2003; Thurston et al., 2002; Ruiz et al., 2002, Namula et al., 2013; Vilagra et al., 2015) en esta investigación el porcentaje de motilidad promedio en semen descongelado, fue del 30 %, y en cuanto a raza la motilidad más alta se obtuvo en la raza Yorkshire con 37 % porcentajes diferentes a los reportados por Bwanga et al., (1991a) al congelar semen porcino en minipajillas.

El porcentaje de espermatozoides vivos, los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que el cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó daños en la membrana plasmática de los espermatozoides, ocasionándole la muerte. Los daños a la membrana provocaron una disminución significativa ($P<0.05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen descongelado. La raza Yorkshire mostró el porcentaje más alto de espermatozoides vivos, en segundo lugar la raza Landrace y con el porcentaje más bajo la raza Duroc. Estos resultados coinciden con los reportados por Flores, (2005); Al congelar semen de cerdo, para evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática, utilizando tasas de enfriado lento, reportó una disminución promedio del 30 % de

espermatozoides vivos en semen descongelado. Arancibia-Salinas et al., (2007), reportó porcentajes de espermatozoides vivos muy similares a los encontrados en esta investigación en espermatozoides descongelados de cerdo de las razas, Yorkshire, Landrace y Duroc utilizando la técnica de congelación de Thilmant. Martínez et al., (2006).

Namula et al., 2013), reportaron que el enfriado del espermatozoide en general disminuye el porcentaje de células con membrana intacta, sobre todo cuando el enfriado se realiza en forma rápida, ya que se considera que la membrana plasmática es la estructura celular que presenta mayor daño en su integridad (Watson, 2000; Holt et al., 2005; Meyers, 2005; López et al., 2013).

Al evaluar los espermatozoides vivos con acrosoma intacto en esta investigación, se encontró que la temperatura de criopreservación provocó daños en las membranas ocasionando en el espermatozoide una prematura reacción acrosomal, provocando una disminución significativa ($P < 0.05$), de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en semen descongelado. La raza Yorkshire mostró el mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, la raza Landrace en segundo lugar y con el menor porcentaje la raza Duroc, resultados que coinciden con los reportados por Arancibia-Salinas et al., (2007), quienes al evaluar semen congelado de cerdo con la técnica de Thilmant, encontraron una disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, reportaron en la raza Yorkshire el mejor porcentaje comparado con la raza Landrace y Duroc.

Por otro lado Flores (2005), obtuvo una disminución del 20 % de espermatozoides con acrosomas normales cuando congeló semen de cerdo con tasas de enfriado lento. Watson, (1995); y De Leeuw, et al., (1991), reportaron que la pérdida de la membrana acrosomal, se ha asociado al choque por frío.

La mejor preservación de la integridad de la membrana acrosomal puede estar asociada a condiciones favorables al momento de congelar, ya que el daño a esta estructura ocasiona disrupción y pérdida de la membrana acrosomal, asociados al choque por frío (Watson, 1995; De Leeuw, et al., 1991; Matas et al., 2002; Ruiz et al., 2002; Okazaki et al.,

2012; López et al., 2013,), al proceso de formación de hielo intracelular (Mazur, 1985), y al proceso de transición de fases de la membrana lipídica (Holt and North, 1984 ; Vilagra et al., 2015; Yeste et al., 2015).

Conclusión

La temperatura de criopreservación, provocó cambios significativos ($P < 0.05$) en el espermatozoide de cerdo en todas las variables consideradas como parámetros de viabilidad en esta investigación en las razas de cerdo York, Landrace y Duroc.

Referencias

- Almlid, T and Hofmo, P.O. (1996). A brief review of frozen semen application under Norwegian IA: service conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 31: 169-173.
- Arancibia-Salinas K; Juárez-Mosqueda M.L; Montaldo, HH; Gutiérrez, C.G; Trujillo OMG; Hernández-González, E.O y Muñoz, GR (2007). *Veterinay Res*. 1 (2): 49-56.
- Bwanga, C.O; Einarsson, S; Rodríguez-Martínez, H. (1991a). Deep freezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod. Dom. Anim*. 26: 117-125.
- Curry, M.R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod*. 5: 46-52.
- De Leeuw, F.E; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. (1991). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim*. Suppl. 1: 95-104.
- Flores, G.H.F. (2005). Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. *Tesis de Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal. Fes-C UNAM*.
- Gadea, J.; Ruiz, S.; Sellés, E. (2003). Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen porcino. *ITEA* 24: 330-332.
- Guthrie, H.D. and Welch G.R. (2005). Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 63: 396-410.
- Holt, W.V; Medrano, A; Thurston, L.M; Watson, P.F (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: Insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* . 63:370-382. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626405>
- Holt, W.V; Medrano, A; Thurston, L.M; Watson, P.F (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: Insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* . 63:370-382.

- Huang, S.Y; Kuo, Y.H; Lee, W.C; Tsou, H.L; Chang, H.L; Wu, J.J, Yang, PC. (1999). Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology* 51:1007-1016.
- Kumar, S.; Millar, J.D.; Watson, P. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46:246-253.
- L. Fraser, J. Strzeżek, W. Kordan. (2014) Características de los espermatozoides post-deshielo tras el almacenamiento a largo plazo de semen de cerdo en nitrógeno líquido
Ciencia de reproducción animal , Volumen 147, Número 3, páginas 119-127 .
Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24819551>.
- López, A., Rijsselaere, T., Beek, J., Vyt, P., Van, A., & Maes, D. (2013). Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Syst Bio Reprod Med*, 59(1), 5–12. Recuperado de:
www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19396368.2012.725120.
- Martínez, O.; Juárez-Mosqueda, M. L.; Hernández, Espinoza, J.; Valencia, J. (2006). Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 66:1969-1975.
- Meyers, S.A. (2005). Spermatozoa response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.* 89:57-64.
- Namula, Z., Sato, Y., Kodama, R., Morinaga, K., Luu, V., Taniguchi, M., Nakai, M., Tanihara, F., Kikuchi, K., Nagai T., & Otoi, T. (2013). Motility and fertility of boar semen after liquid preservation at 5°C for more than 2 weeks. *Anim Sci J*, 84: 600-606. Recuperado de: dergipark.gov.tr/download/article-file/121974
- Nayarit. Síntesis geográfica de Nayarit. Ed. Reckard Impresores S.A. México, D.F.
- Neild, D.M.; Gadella, B.M.; Chaves, M.G.; Miragaya, M.H.; Colenbrander, B.; Agüero, A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59:1693-1705.
- Noiles, E.E.; Thompson, K.A.; Storey, B.T. (1997). Water permeability of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology*. 35:79-92.
- Okazaki, T; Akiyoshi, T., Kan, M., Mori, M., Teshima, H., & Shimada, M. (2012). Artificial Insemination With Seminal Plasma Improves the Reproductive Performance of Frozen-Thawed Boar Epididymal Spermatozoa. *J Andrology*, 33(5), 990–998. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282435>
- Ostermeier, G.; Saito, R.; Susko, J.L.; Parrish, J.J. (2000). Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag Biothenet*. Vol 2. September ABN055.
- Polge, C. (1970). The development of artificial insemination service for pigs. *Anim. Bredd. Abstrac.* 24:209-217.
- Roca, J.; Carvajal, G.; Lucas, X.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A. (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 60:77-87.
- Ruiz, S.; Sellés, E.; Gadea, J.; Marco, Ma.; Murgas, L. (2002). Effect of freezing rate on boar semen frozen: preliminary results of A.I. *Theriogenology*. 57: 480. Abstrac.
- Sellés, E.; Gadea, J.; Romar, R.; Matás, C.; Ruiz, S. (2003). Analysis of in vitro fertilizing

- capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 38. 66-72.
- Vilagra, I., Yeste, M., Sancho, S., Castillo, R., Oliva, R., & Bonet, S. (2015). Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*, (3), 345–356. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678437>
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen *Anim. Reprod. Science.* 61:481-492.
- Westendorf, P.; Richter, L.; Treu, H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebesperma. Laboround Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletenverfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr* 82:261-267.
- Yeste, M. (2015). Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and current Perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*. pp 71-79. Recuperado de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12569/full>.